

A zárójelentés beszámolója

A kutatási program célja az volt, hogy megértsük a *Horka*, a *Kompolt* és a *Himca* gének szerepét a *Drosophila* peték megtermékenyülésében. Három olyan génét, amelyeket a *Himca^D*, a *Horka^D*, valamint a *Kompolt^D* domináns nőtény-steril mutációkkal azonosítottunk, mely gének termékeinek szerepe van a megtermékenyülésben, az embriógenézis elkezdődésében. Célul tűztük ki

- (i) a *Himca^D*, a *Horka^D*, valamint a *Kompolt^D* mutációkkal kapcsolatos mutáns fenotípus jellemzését,
- (ii) a mutációk természetének (hogyan t.i. domináns negatív, neomorf, vagy haplo-elégtelen) megállapítását,
- (iii) a *Himca^D*, a *Horka^D*, valamint a *Kompolt^D* mutációkkal azonosított ép gének molekuláris klónozását,
- (iv) olyan transzgének készítését, amelyek az ép géneket tartalmazzák, menekítik a funkcióvesztéses allélokkal kapcsolatos defektusokat,
- (v) az ép *Himca*, *Horka* és a *Kompolt* gének termékeinek láthatóvá tételét, vagy ellenanyaggal, vagy „nyomjelző” fluoreszcens fehérjével jelölt fehérjék vizsgálatával,
- (vi) tudományos előadások, dolgozatok, Ph.D. értekezések készítését.

Azért, hogy molekuláris szinten ismerjük meg a megtermékenyülés korábban soha nem látott jellegzetességeit, különös tekintettel a spermium szerepére. Munkánk kezdetén fogalmunk sem volt a három gén lehetséges funkciójáról. A későbbiekben bemutatottakból kiderül, hogy a vállalt feladatokból mind a hat teljesült, vagy közel van a beteljesüléshez.

A *Himca^D*, a *Horka^D*, valamint a *Kompolt^D* mutációkból kiindulva az ép *Himca*, *Horka* és *Kompolt* gének funkciójáról a következőket tudtuk meg.

Himca

A *Himca^D*, valamint a *himca^{RP}* mutáns allélok, mint azt korábbi jelentéseimben összefoglaltam, a *Drosophilának* azt a CG4026 génjét azonosítják, amelynek terméke az inozitol-1,4,5-trifoszfát-kináz enzim. Az enzim az inozitol-1,4,5-trifoszfátból inozitol-1,3,4,5-tetrafoszfátot (ITF) készít, a másodlagos hírvivők egyikét. A másodlagos hírvivő a Ca^{2+} ionok belső raktárakból történő felszabadulásáért felelős. Azt gondoljuk, hogy ITF hiányában (a *Himca^{D/+}*, *himca^{RP/-}* hemizigóta nőtények petéiben) a Ca^{2+} ion-hullámok rendellenes lefutása (vagy hiánya) okozza a megtermékenyüléssel, a spermiumfarok elhelyezkedésével, illetve az embriógenézis elkezdődésével kapcsolatos problémákat. Vélekedésünket igazolandó Ca^{2+} ionokat fluoreszkálva érzékelő ún. kaméleon fehérjék vizsgálatát tervezzük. (A kaméleon fehérjék képződését olyan transzgén kódolja, amely már rendelkezésünkre áll.) Tervezzük továbbá olyan *Himca-GFP* transzgének készítését is, amelyek terméke, a Himca-GFP fúziós fehérje, láthatóvá teszi a Himca fehérjét az egyedfejlődés különféle stádiumaiban, a különféle szövetekben. 2007. kezdetén bizonyosan tudjuk, hogy mely gént azonosítják a *Himca^D*, és a *himca^{RP}* mutáns allélok (a CG4026-ot). Elvégeztük a mutáns fenotípusok jellemzését, és érteni véljük a CG4026 gén funkcióját. A Himca történetben már csak néhány feladat várta magára: a Ca^{2+} ion-hullámok lefutásának tanulmányozása, a Himca fehérje kimutatása *Himca-GFP* transzgén alapján, és talán a *Himca^D* allél molekuláris természetének megismerése. Becslésem szerint félévnyire vagyunk a Himca project első közleményének összeállításától.

Horka

A *Horka^D* mutáció - amely egyaránt okoz domináns nőtény-sterilitást, kromoszóma instabilitást és polispermiát -, valamint funkcióvesztéses alléljai (mint pl. *horka^{null}*) azt a *Horka* gént azonosítják, amely a transzkripció-terminációs-faktor-2 (TTF2) képződését kódolja. A TTF2 a transzkripció szabályozás egyik eleme: alkalmas feltételek teljesülése esetén eltávolítja az RNS polimeráz-II enzimet a DNS-ről, amivel a transzkripció abortív terminációját okozza. A TTF2 szerepe különösen fontos a mitózis kezdetén, amikor az RNS polimeráz-II-t eltávolítja a kromoszómákról.

Lévén domináns negatív típusú, a *Horka^D* mutáció megakadályozza, hogy a *Horka^{D/+}* nőtények petekezdeményeiben az ép (+) *Horka* gén ép TTF2 terméke kifejtse funkcióját. Lényegében ugyanaz a helyzet, mint a *horka^{null/-}* hemizigóta nőtények petekezdeményeiben, amely nőtényeknek nincs funkcióképes *Horka* génje. A TTF2 funkcióját ismerve arra számíthatunk, hogy a *Horka^{D/+}* és a *horka^{null/-}* nőtények petéiben olyan ép gének termékei bukkannak fel, amelyek rendes körülmények között ott nincsenek jelen (vagy csak csekélyke mennyiségben), amely géntermékek miatt mérgező a fenti nőtények petéjének citoplazmája. Valóban, a mutáns nőtények petéinek citoplazmájából izolált nyomnyi mennyiséget a vad típusú embriókba injektálva azokat megmérgezi. A *horka^{null/-}* nőtények petéinek mérgező citoplazmája a nőtény-sterilitás eddig ismeretlen típusára derített fényt: a pete citoplazma azért mérgező, mert benne bár ép, de ott rendesen elő nem forduló gének termékei vannak jelen.

A kérdést, hogy mely gének expressziós mintázata változik meg a *Horka^{D/+}* és a *horka^{null/-}* nőtényekben a DNS csip módszerével vizsgáltuk meg: össz-poli-A-RNS-t izoláltunk, melyek alapján cDNS-t szintetizáltunk, majd meghatároztuk - DNS csipekkel -, hogy mely gének expressziós mintázata változott meg a kontroll (+/+) nőtények petéihez képest. (Eredményeinket az RT-Q-PCR módszerével megerősítettük.) A *Horka^{D/+}* és a *horka^{null/-}* nőtények petéinek RNS mintázata szinte azonos módon változott. Kiderült, hogy bennük 54 olyan gén terméke van jelen, amelyek rendes körülmények között ott nem fordulnak elő.

Ha vélekedésünk igaz, készíthetünk olyan nőtényeket, amelyek genotípusa *Horka^{D/+}* vagy *horka^{null/-}*, ám belőlük egy deficienciával kiejtettük az 54 gén valamelyike két kópiájának az egyikét. A fenti feltételezés helyesnek bizonyult. Kísérleteink megmutatták, hogy 18 olyan gén van, amelyek egyik kópiájának eltávolítása nyomán jelentősen javulnak az embriók fejlődésének esélyei. Igazunkat bizonyítandó olyan nőtények készítése is folyamatban van, amelyek petekezdemény sejtjeiben a nevezetes 18 gén funkcióját egyenként szüntettük meg az RNS-interferencia technikával.

Próbálkozásaink a TTF2 molekulák láthatóvá tételére sikerrel kecsegtetnek. Először poliklonális anti-TTF2 ellenanyaggal próbálkoztunk. (Az ellenanyag minták David Glover, valamint a David Price laboratóriumokból származtak, Cambridge-ből és Iowa-ból.) 2006. végén derült ki, hogy az a váratlan tény, hogy a TTF2 génnek van egy máig ismeretlen funkciójú homológja *Drosophilában*, a CG10445 jelű gén. Minthogy az anti-TTF2 poliklonális ellenanyag nemcsak a TTF2-t, hanem a CG10445-kódolt fehérjét is felismeri, a TTF2 jelenlétét bemutató, konfoklis mikroszkóppal készített felvételeink értéküket veszítették. A helyzetet komplikálja, hogy a TTF2 és a CG10445 gének szomszédosak, és ugyanazt a promotert használják. Időközben közel kerültünk a CG10445 gén szerepnek tisztázásához is, olyan zigóták készítéséhez, amelyekből hiányzik a CG10445, ám jelen van a *Horka* gén.

Próbálkozásaink olyan transzgének készítésére, amelyek vagy az N-, vagy a C terminális végükön CFP-vel (YFP-vel vagy mRFP-vel) fluoreszcensen jelölt TTF2, illetve a *Horka^D*-kódolt A777T-TTF2 képződését kódolja, sikerrel jártak. Első lépésben tizenkét DNS konstrukciót készítettünk: olyanokat, amelyek az N-, illetve a C-terminális végen CFP-vel YFP-vel vagy mRFP-vel jelölt TTF2, illetve A777T-TTF2 képződését kódolja. A DNS konstrukciókat - hogy jóságukról meggyőződünk - először S2 jelű, tenyésztett *Drosophila*

sejtekbe transzfektáltuk. Mivel az S2 sejtekben a 12 DNS konstrukció mindegyike „működött”, vagyis kivilágította a sejtmagot, a DNS konstrukciók alapján elkezdhattuk a transzgének készítését. Azért, hogy jellemezhessük az ép és a mutáns A777T-TTF2 szerepét a megtermékenyülésben, a sejtek és a kromoszómák életében. Az első CFP-TTF2 és CFP-*Horka^D* transzgénikus muslicák a napokban fognak megszületni...

A *Horka* génnel kapcsolatos kutatási eredményeinkből máig két kézirat született, valamint egy Ph.D. értekezés van készülőben:

- Szalontai, Tamás, Belec, István, Kerekes, Irén, Erdélyi, Miklós, Boros, Imre and Szabad, János, Absence or the presence of a dominant negative form of transcription termination factor 2 alters germ line function in *Drosophila* through the induction of excess chromosome tangling and instability.

(A kéziratot a Genetics folyóiratba szándékozunk közlésre benyújtani.)

- János Szabad, Tamás Szalontai, Imre Gáspár, István Belec and László Puskás, Lack of transcription-termination-factor-2 in *Drosophila* results in abnormal deposition of normal proteins into the egg cytoplasm causing chromosome tangling, death of the embryos and female sterility.

(A kéziratot a Nature Genetics folyóiratba szándékozunk közlésre benyújtani.)

- Tamás Szalontai, The *Horka^D* and the *horka^{null}* mutant alleles of *Drosophila* identify the transcription-termination-factor-2 gene and reveal a novel type of female sterility. Ph.D. thesis.

(Előkészületben.)

Kompolt

Jellemeztük mind a *Kompolt^D* domináns negatív természetű nőstény-steril mutációval, mind pedig a *kompolt^{null}* funkcióvesztéses mutáns alléllal kapcsolatos mutáns fenotípust. (A mutáns fenotípusok leírását a korábbi jelentések tartalmazzák.) Egy P-elemmel indukált *kompolt^{rP}* allélból kiindulva az inverz PCR technika módszerével megklónoztuk a *Kompolt* gént (amit a *Drosophila* genom projektben még CG7466-ként ismernek). Megtudtuk, hogy a *Kompolt* gén terméke egy olyan, meglehetősen nagy transzmembrán fehérje, amely többféle, és több kópiában meglevő, és ismert domént tartalmaz (CUB, EGF, PSI, Kelch). Számítógépes vizsgálataink azt jelzik, hogy a doménoknak a spermium adhézióban, a sejt-sejt kölcsönhatásban, valamint a szingnáltranszdukcióban van szerepe.

A *Kompolt* fehérjét meglátandó polipeptid típusú anti-*Kompolt* poliklonális ellenanyagot készítettünk nyulakban. Az ellenanyag világosan megmutatta, hogy a *Kompolt* fehérje része az akroszómának, és a peték citoplazmájának is. A *Kompolt* fehérje eloszlásának jellemzése az oo-, illetve a spermatogenezis folyamatában befejezéséhez közeledik.

Dolgozunk olyan transzgén készítésén is, amely GFP-*Kompolt* fehérje képződését kódolja. A feladatot nehezíti, hogy a *Kompolt* gén nem túl rövid (kb. 12 kbp), és nem túl egyszerű olyan transzgén készítése, amely *Kompolt* gén mellett tartalmazza a marker mutációt, valamint a GFP-t kódoló szekvenciát is.

A *Kompolt* gén jellemzésének, molekuláris funkciójának vizsgálatát közlésre előkészítettük, és reményeink szerint még 2007-ben benyújtjuk közlésre.